

Aus der I. Inneren Abteilung d. Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM,
München

(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON VM26 (PODOPHYLLINDERIVAT)

AUF KNOCHENMARKKULTUREN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Frank Naacke

aus Dresden

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Inneren Abteilung d. Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM,
München

(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON VM26 (PODOPHYLLINDERIVAT)
AUF KNOCHENMARKKULTUREN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Frank Naacke

aus Dresden

Referent : Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent : Prof. Dr. Dr. Rudolf Stellmach

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 2. 10. 1972



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
II. MATERIAL UND METHODE	7
III. ERGEBNISSE	11
A. Differentialzählungen.	11
B. Signifikanzberechnung.	33
C. Zusammenfassung der Ergebnisse	43
IV. DISKUSSION	50
V. ZUSAMMENFASSUNG	53
VI. LITERATURVERZEICHNIS	54

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Nachdem KAPLAN die günstige Wirkung von Podophyllin bei der Behandlung von Condylomata acuminata entdeckt hatte, wurde 1947 von SULLIVAN und WECHSLER seine hemmende Wirkung auf die Zellteilung beschrieben (9, 13, 15). Dabei war die Podophyllum-Droge schon seit Jahrhunderten bekannt; sie wurde von den Indianern Nordamerikas als Emetikum, Anthelmintikum und lokal als Antidot bei Mückenstichen benutzt (9, 13). Das Erkennen des hemmenden Einflusses auf die Zellteilung führte zur Entwicklung von Podophyllinsäure-äthylhydracid (Proresid^R, SP-I), einem Zytostatikum mit antimitotischer Wirkung, welches außerdem hemmend auf den Metabolismus der Nukleinsäuren und auf die Biosynthese der Proteine einzuwirken scheint (17, 19). Trotz der in vivo (9, 17, 19) und in vitro an menschlichen Knochenmarkkulturen (6, 13) nachgewiesenen zytostatischen Wirkung, die der der Mitosegifte Colchicin, Vinblastin u. a. ähnlich ist und eine Arretierung in der Metaphase hervorruft, veranlaßte die geringe therapeutische Breite eine weitere Entwicklung (6, 9, 17).

Dabei stieß eine Forschungsgruppe der SANDOZ AG auf 4'-Demethyl-epipodophyllotoxin-thenyliden-glucosid (VM26), welches nicht wasserlöslich ist und daher nur in Verbindung mit organischen Lösungsmitteln (Tween 80, DMSO) benutzt werden kann. Es weist eine größere zytostatische Wirkung in Zellkulturen auf, jedoch im Gegensatz zu allen vorher bekannten aktiven Podophyllotoxin-Derivaten ruft es keine Anhäufung von Metaphasen hervor. VM26 wurde in vitro an Zellkulturen von P-815 mastocytoma, KB-Zellen und Hühnerembryo-Fibroblasten getestet, in vivo an verschiedenen Stämmen von Ratten und Mäusen mit Sarkomen 37, 180, Walker-Carcinosarkom und an überimpften Zellen von Leukämie P-815, L-1210 und P-1534 (15, 16).

An den in vitro getesteten Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen stellte STÄHELIN fest, daß es nach einer Versuchsdauer von mehr als 60 Minuten bei einer Konzentration über 1 µg/ml VM26

zur Auflösung von Zellen kommt, und die Zellen, die sich zur Mitose vorbereitet hatten, in kleine Tröpfchen zerfielen. Bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VM26 zeigte sich selten Zerfall von Zellen, aber sämtliche Mitosephasen einschließlich der Prophase waren wesentlich verringert oder fehlten ganz, weil der Beginn der Mitose verhindert wurde. Im Gegensatz zu den klassischen Mitosegiften und Proresid^R konnte weiterhin festgestellt werden, daß es sich bei der Wirkung von VM26 um eine irreversible handelt. Wurde den Fibroblastenkulturen VM26 nur für eine Stunde zugesetzt, dann gegen frisches Medium ausgetauscht, so war die Wirkung für mindestens 24 Stunden die gleiche wie in den Kulturen, bei denen VM26 nicht entfernt wurde.

Bei den in vivo getesteten Tumoren, einschließlich Walker-Carcinosarkom und Leukämie P-1534 an Ratten- und Mäusestämmen, lag die Antitumorwirkung - ausgedrückt durch Reduzierung des Tumorgewichtes oder Steigerung der Überlebenszeit - zwischen 30 und 100 %. Bei der Mäuse-Leukämie L-1210 zeigten die umfangreichen Behandlungspläne, daß die Überlebenszeit von 121 % bei täglicher i.p. Behandlung auf 373 % bei nur zweimaliger Behandlung pro Woche gesteigert werden konnte. Das zeigt, daß die Erfolgsquote bei Leukämietumoren größer ist. Die Leukämie wurde subcutan eingepflegt. Bei intracerebral eingepflegter L-1210 betrug die Antitumorwirkung nur 36 - 56 % (14, 15).

Bei 203 Patienten, welche an Morbus Hodgkin, Reticulosarkomen und Blasenkarzinomen erkrankt waren, und bei 29 Patienten mit ebenfalls fortgeschrittenen neoplastischen Krankheiten, die auf die herkömmlichen Zytostatika nicht mehr ansprachen, wurde eine Behandlung mit VM26 vorgenommen. Die Nebenwirkungen wurden mit wesentlicher Knochenmarkstoxizität (12 schweren Pancytopenien mit Knochenmarksaplasie, 30 mittelschweren Neutropenien, Thrombocytopenien), Verdauungsstörungen und Alopecie angegeben (8, 21).

In der vorliegenden Arbeit soll nun die direkte Wirkung von VM26 auf die Regeneration und Reifung am isolierten menschlichen Knochenmark untersucht werden. Dabei sind mögliche nervale und humorale Einflüsse ausgeschaltet.

II. MATERIAL UND METHODE

Das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark von fünf Patienten mit mehr oder weniger pathologischen Veränderungen bildet den Ausgangspunkt unserer Arbeit.

Als erstes wurden je zwei bis drei Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Danach wurden Kulturen nach der von Boll modifizierten Carrel'schen Deckglasmethode angelegt (2, 6). Ein Gemisch, bestehend aus einem Teil Corrhormon^R dreifach verstärkt, fünf Teilen autologem Plasma, vier Teilen autologem Serum und einem Teil VM26^{*)}, wird auf einen Objektträger appliziert, wo es sich zum Koagulum umbildet. Darauf wird nun ein Knochenmarkbröckchen gebracht und mit einem Serumtropfen mit derselben Konzentration VM26 überschichtet. Nachdem ein am Rande mit Vaseline beschickter Hohlschliffträger auf den Objektträger gestülpt worden ist und mit Hartparaffin verschlossen wurde, wird beides herumgedreht und die fertige Kultur in Form eines hängenden Tropfens im Brutschrank bei 37° C inkubiert (2).

Es wurden folgende Knochenmarkkulturen von diesen fünf Patienten angesetzt :

1. Kontrollkulturen ohne VM26-Zusatz
2. Kulturen mit einem Zusatz von 0,1 µg/ml VM26
3. Kulturen mit einem Zusatz von 1,0 µg/ml VM26

Vier Tage lang wurden nach jeweils 24 Stunden von jeder Kultur Präparate angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Sie wurden meistens in dreifacher Ausfertigung angelegt, um die durch das Ausstreichen auftretenden Schwankungen auszugleichen. Zur Auswertung dieser Präparate suchten wir uns eine Stelle mit aufgelockerter Zellverteilung aus. Diese fanden wir fast ausschließlich in der Fahne des Ausstriches.

*) Wir danken der Fa. SANDOZ für die Überlassung des Präparates.

Es folgte die meanderförmige Abtastung und Differenzierung der Zellen. Es wurde versucht, pro Präparat mindestens 2000 Zellen zu erfassen, um die unterschiedliche Zellverteilung auszugleichen. Retikulumzellen, Plasmazellen, Megakaryocyten und Lymphocyten wurden ebenfalls differenziert, aber nicht mit zur Auswertung herangezogen.

Die Erythropoese wurde differenziert in

1. Proerythroblast (PE)
2. Basophiler Erythroblast (bE)
3. Polychromatischer Erythroblast (pE)
4. Oxyphiler Erythroblast (oE)
5. Reifer Erythroblast (rE)

Die Granulocytopoese wurde differenziert in

1. Myeloblast (MB)
2. Promyelocyt (PM)
3. Myelocyt (MC)
4. Eosinophiler Myelocyt (eMC)
5. Basophiler Myelocyt (bMC)
6. Promonocyt (PMo)
7. Metamyelocyt (MM)
8. Stabkerniger (StG)
9. Segmentkerniger (SG)
10. Eosinophiler Segmentkerniger (eSG)
11. Basophiler Segmentkerniger (bSG)
12. Monocyt (Mo)

Die Differenzierung der Zellen erfolgte aufgrund von Reifungsunterschieden in den einzelnen Stadien (3, 5).

Als Kriterien dienten

1. die ZellgröÙe
2. die Kerne nach Form, Struktur und GröÙe
3. das Zytoplasma

An dieser Stelle wird auf Zellen, deren Beschreibung von Boll und Mitarbeitern veröffentlicht wurde, nicht mehr eingegangen.

Eine dem Promyelocyten an Größe vergleichbare Zelle der weißen Reihe finden wir in dem Promonocyten. Jedoch weist der Kern mit dem locker erscheinenden Chromatin häufig an einer Stelle Einbuchtungen auf. Auf dem breiten, rauchgrauen Zytoplasmasaum finden wir manchmal zarte, azurophile Granulation an.

Der Promonocyt reift zum Monocyten, bei dem wir dann einen großen, gelappten, polymorphen Kern mit dem gleichen rauchgrauen Zytoplasma vorfinden.

Da für uns die Mitoseaktivität von großer Bedeutung ist, möchten wir hier auf eine kurze Beschreibung Wert legen.

Die Mitosephasen teilen sich wie folgt ein :

- 1) Prophase : Der Kern verliert seine scharfe Grenze zum Zytoplasma hin; er wird aufgelockert. Es werden helle Zwischenräume sichtbar, die durch die Umordnung der als dichte Fäden vorhandenen Chromosomen entstehen.
- 2) Frühe Metaphase : Sie ist durch die weitere Auflockerung der Chromosomen gekennzeichnet. Diese sind teilweise über die ganze Zelle verstreut.
- 3) Späte Metaphase : Wir finden eine kreisförmige, zum Mittelpunkt gerichtete Anordnung der Chromosomen vor. Dieser Monaster erscheint uns in der Aufsicht als Äquatorialplatte.
- 4) Anaphase : Der Monaster teilt sich in zwei Hälften und bildet einen Diaster. Durch die Polkörperchen teilen sich die verdoppelten Chromosomen in zwei Hälften und bilden einen Diaster.
- 5) Telophase : Die beiden Hälften der Chromosomen bilden sich zu einem Dispirem aus, während die Einschnürung des Zellleibes eingesetzt hat.

- 6) Rekonstruktionsphase : Wir finden zwei meist etwas kleinere Tochterzellen vor. Oft ist noch deutlich ein Plasmafädchen vorhanden. Die Chromosomen sind wie in der Prophase in festem Spirem angeordnet und von dieser oft nur durch die Lage der Zellen zueinander zu unterscheiden.

III. ERGEBNISSE

A. Differentialzählung

Von den Kulturreihen mit dem Knochenmark der fünf Patienten wurden alle angefertigten Ausstriche ausgewertet. Dabei konnten ca. 75 000 Zellen klassifiziert werden. Die Ergebnisse der Auszählung wurden graphisch in sogenannte Reifungskurven übertragen, durch deren Darstellung uns das Erkennen prozentualer Veränderungen der einzelnen Zellarten und Reifungsstadien erleichtert wird.

Die gefundenen Mitosen wurden für die rote und weiße Reihe getrennt nach der Formel

$$M I = \frac{\text{Anzahl der Mitosen (rot oder weiß)} \times 1000}{\text{Anzahl der teilungsfähigen Zellen (rot oder weiß)}}$$

in sogenannte Mitoseindices umgerechnet.

Dabei sind in der roten Reihe der Proerythroblast,
der basophile Erythroblast,
der polychromatische Erythroblast
und der oxyphile Erythroblast

und in der weißen Reihe der Myeloblast,
der Promyelocyt,
der Myelocyt,
der Promonocyt
und der Metamyelocyt

teilungsfähig.

Das Verhältnis der gesamten Zellen der Granulocytopoese und der Erythropoese wurde durch den $\frac{G}{E}$ -Index ausgedrückt.

Fall 1

Konrad U., 81 Jahre

Klinische Diagnose :

Mycosis fungoides mit knotigen Infiltraten
Lungenemphysem
Minderdurchblutung des linken Beines

Medikation vor dem Sternalpunktat :

Sanamycin^R (1 Woche 200y/die, 2 Wochen 300y/die)
Urbason retard^R, Rovigon^R, Novodigal^R, Lasix^R

Befund des Sternalpunktates :

Reaktive Retikulumzellvermehrung und Vermehrung
der Erythropoese

Blutbild : Ery. : 3,7/ μ l
 Hb : 14,1 g%
 Hb_E : 38 pg
 Leuko.: 4600/ μ l

BSG nach Westergren : 5/11 mm

Serumelektrophorese :

	Normalwerte	
Albumin	(55 - 70)	55 %
Alpha-1-Globulin	(2 - 5)	7 %
Alpha-2-Globulin	(4 - 9)	10 %
Beta-Globulin	(9 - 12)	11 %
Gamma-Globulin	(13 - 20)	17 %
Gesamt-Eiweiß	(5 - 7)	6,91 g%

Bei der Betrachtung der Reifungskurven ist bei der Erythropoese (Abb. 1a) ein deutlicher Unterschied zwischen den Versuchs- und den Kontrollkulturen feststellbar. Die Kurve der

Versuchsreihe ist gegenüber der Kontrolle nach links verlagert, was eine stärkere Abnahme der teilungsfähigen Zellen bedeutet. Dieser Unterschied bleibt bis zu 72 Std. erhalten, wenn es dann auch zu einer Annäherung der Kurven kommt.

In der Granulocytopoese (Abb. 1b) finden wir dagegen nach 24 Std. eine Zunahme der teilungsfähigen Zellen gegenüber den Kontrollen vor. Nach 48 Std. kommt es zu einem Ausgleich, der auch nach 72 Std. anhält.

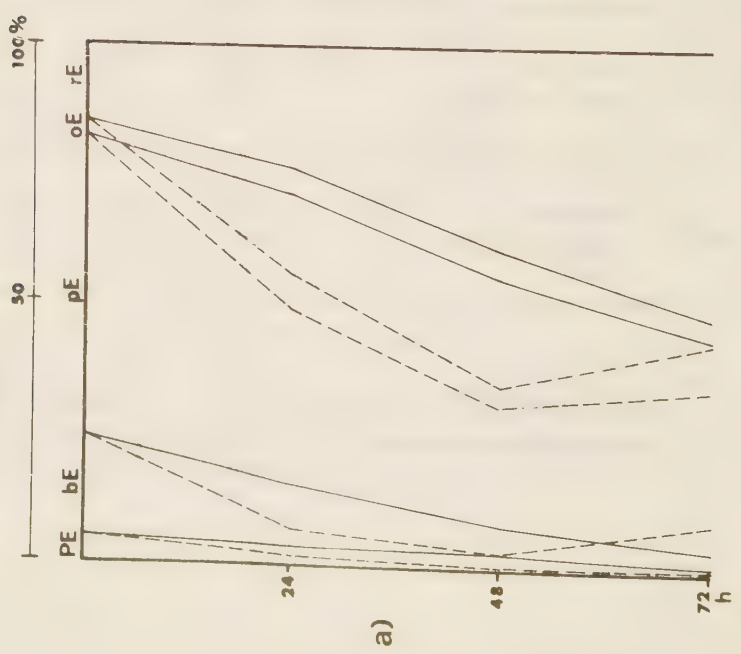
Die $\frac{G}{E}$ -Indices der einzelnen Tage verhalten sich den Reifungskurven entsprechend, jedoch sind die Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollreihe nicht erheblich (Tab. 1).

Die roten Mitose-Indices (rMI) der Versuchsreihe sind wie auch die weißen (wMI) an allen Tagen deutlich niedriger als die der Kontrollen.

Tabelle 1

		Original	24 Std.	48 Std.	72 Std.
$\frac{G}{E}$ -I	Kontrolle	1,27	0,76	0,88	1,33
	Vers. 0,1 μ g/ml		1,02	1,11	0,76
r M I	Kontrolle	17,46	24,78	27,22	15,4
	Vers. 0,1 μ g/ml		15,5	18,62	7,82
w M I	Kontrolle	13,97	18,66	7,9	5,33
	Vers. 0,1 μ g/ml		11,16	4,16	4,05

Erythropoese



Granulopoese

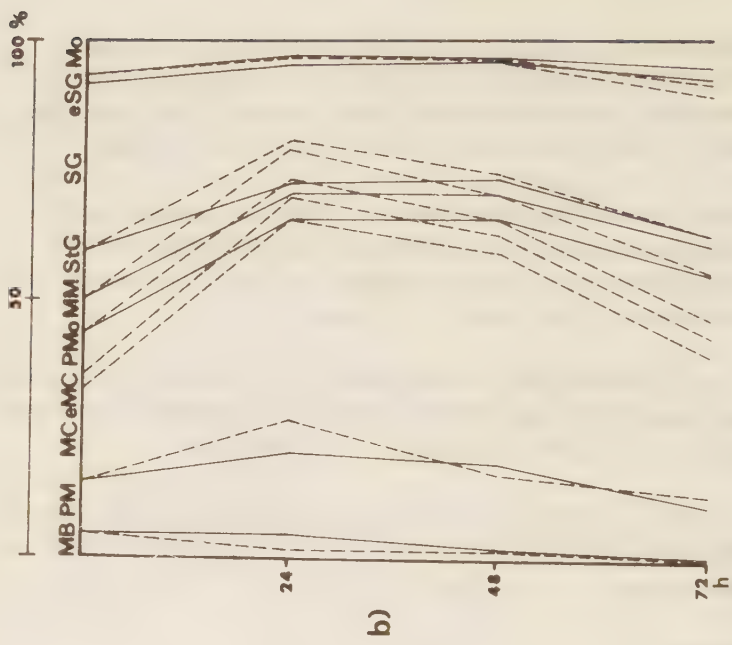


Abb. 1a+1b: Fall 1 mit der Konzentration VM 26 0,1 µg/ml

Beschreibung der Abb. S. 15

Die Abbildungen stellen die Reifungskurven der Erythropoese (a) und der Granulopoese (b) dar.

Auf der Ordinate ist die Zeit in Stunden (h), auf der Abszisse die fortlaufende prozentuale Verteilung der Reifungsstufen der entsprechenden Reihe additiv aufgetragen. Der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsstufen für Versuch und Kontrolle wird durch das Feld dargestellt, das von den entsprechenden Reifungskurven begrenzt wird. Dabei bildet für die zuerst aufgetragene Reifungsstufe die Ordinate die untere Begrenzung, für alle folgenden Reifungskurven stellt die entsprechende Reifungskurve der vorangegangenen Zellgruppe die untere Begrenzung dar.

Für die einzelnen Zellen an der Abszisse sind die zu Anfang beschriebenen Abkürzungen benutzt worden (s. S. 8).

Dabei sind

—————	Kontrollkulturen
-----	VM26-Zusatz der Konzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$
— — — —	VM26-Zusatz der Konzentration 1,0 $\mu\text{g/ml}$

Fall 2

Otto S., 69 Jahre

Klinische Diagnose :

Herpes zoster

Wirbelkörper tuberkulose

Diabetes mellitus

Medikation vor dem Sternalpunktat :

Hepsan^R, Neoteben^R, Rifa 300^R, Myambutol^R,
28 E Depot-Insulin^R/die

Befund des Sternalpunktates :

Linksverschiebung der Granulocytopoese
wie bei entzündlichen Prozessen

Blutbild :

Ery. : 4,02/ μ l

Hb : 13,4 g%

Hb_E : 37,8 pg

Leuko.: 8.100/ μ l

BSG nach Westergren : 55/98 mm

Serumelektrophorese :

Albumin 48 %

α -1-Globulin 5 %

α -2-Globulin 14 %

β -Globulin 11 %

γ -Globulin 22 %

Ges. Eiweiß 6,46 g%

Differentialblutbild :

Stabkernige : 4 %

Segmentkernige : 61 %

Lymphocyten : 26 %

Eosinophile Seg. : 3 %

Basophile Seg. : 1 %

Monocyten : 5 %

Anisocytose : (+)

In der Erythropoese (Abb. 2a) zeigt sich bei den 24- und 48-Stunden-Präparaten der Versuchskulturen mit der niedrigeren Konzentration eine Abnahme der teilungsfähigen Erythroblasten bis zu den polychromatischen und eine Zunahme der oxyphilen und reifen Erythroblasten.

Bei den entsprechenden Präparaten mit der höheren Konzentration (Abb. 3a) findet sich nach 24 Std. ein entgegengesetztes Verhalten.

Nach 48 Std. nehmen bei beiden Konzentrationen nur noch die reifen Erythroblasten zu, bzw. die teilungsfähigen ab, jeweils im Vergleich zu den Kontrollkulturen (Abb. 2a u. 3a).

Nach 72 Std. tritt im Vergleich zu den Kontrollen bei der niedrigeren Konzentration eine Rechtsverlagerung der Kurven, besonders der der basophilen und polychromatischen Erythroblasten ein (Abb. 2a).

In der Granulocytopoese (Abb. 2b u. 3b) sehen wir nach 24 Std. in den Zusatzkulturen eine Linksverlagerung der Reifungskurven gegenüber den Kontrollen.

Nach 48 und 72 Std. verschieben sich die Reifungskurven nach rechts und lassen somit auf eine etwas größere Anzahl teilungsfähiger Zellen schließen.

Auffallend ist die starke Verkleinerung des $\frac{G}{E}$ -Indexes nach 24 Std. und sein weiteres Absinken in den Zusatzkulturen (Tab. 2).

Nach 48 Std. ist der Unterschied der $\frac{G}{E}$ -Indices bei den Versuchen einerseits und den Kontrollen andererseits nicht so erheblich.

Die roten Mitose-Indices beider Versuchsreihen liegen nach

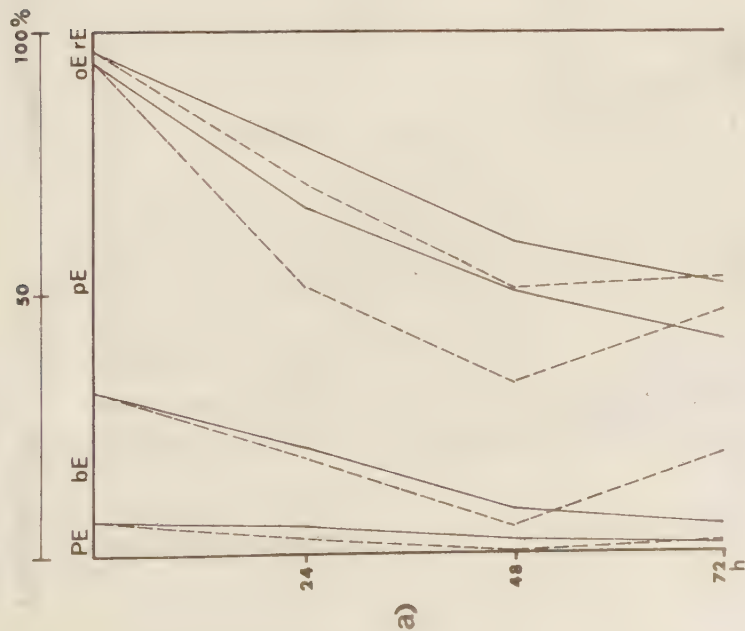
allen Versuchstagen deutlich unter denen der Kontrollen, bei der geringeren Konzentration sind sie allerdings stärker erniedrigt.

Die weißen Mitose-Indices der Versuchsreihen liegen ebenfalls unter denen der Kontrollreihen, wenn auch nicht mit so großen Differenzen. Ausgenommen ist nur der Versuch mit der höheren Konzentration am 1. Tag.

Tabelle 2

		Original	24 Std.	48 Std.	72 Std.
$\frac{G}{E}$ -I	Kontrolle	3,1	1,74	1,93	1,17
	Vers.				
	0,1 $\mu\text{g/ml}$		1,46	1,49	3,03
	1,0 $\mu\text{g/ml}$		1,0	1,47	1,43
r M I	Kontrolle	15,42	17,4	20,82	14,78
	Vers.				
	0,1 $\mu\text{g/ml}$		5,88	8,52	5,29
	1,0 $\mu\text{g/ml}$		12,95	13,05	10,75
w M I	Kontrolle	10,32	14,1	14,0	13,7
	Vers.				
	0,1 $\mu\text{g/ml}$		9,68	9,77	9,25
	1,0 $\mu\text{g/ml}$		14,46	12,43	9,57

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

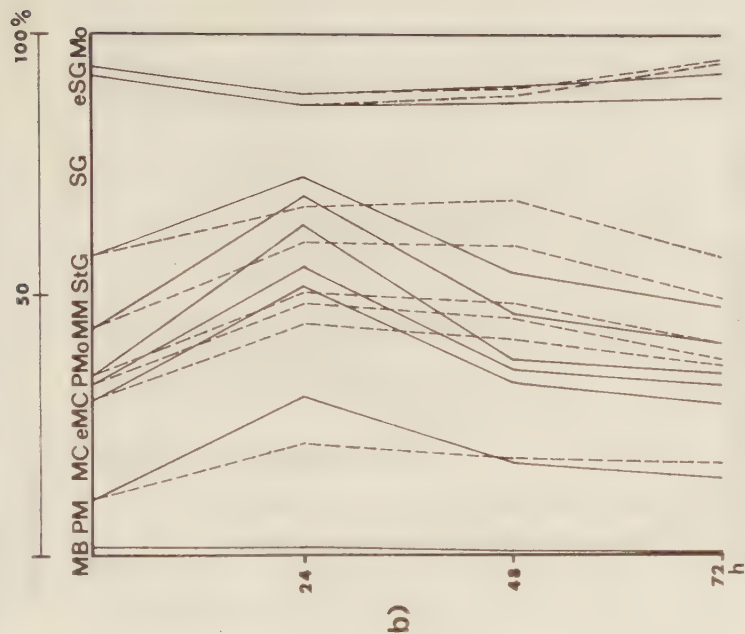
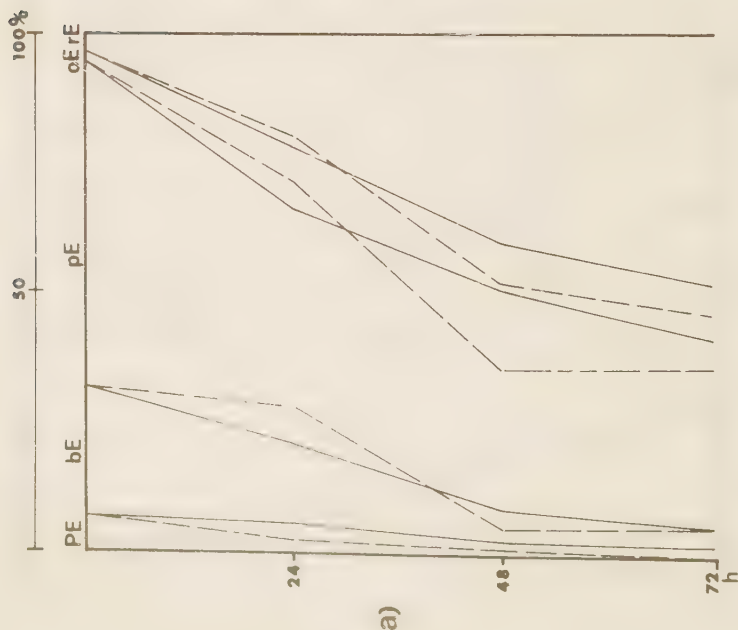


Abb. 2a + 2b: Fall 2 mit der Konzentration VM 26 0,1 µg/ml

Beschreibung der Abb. s. S. 15

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

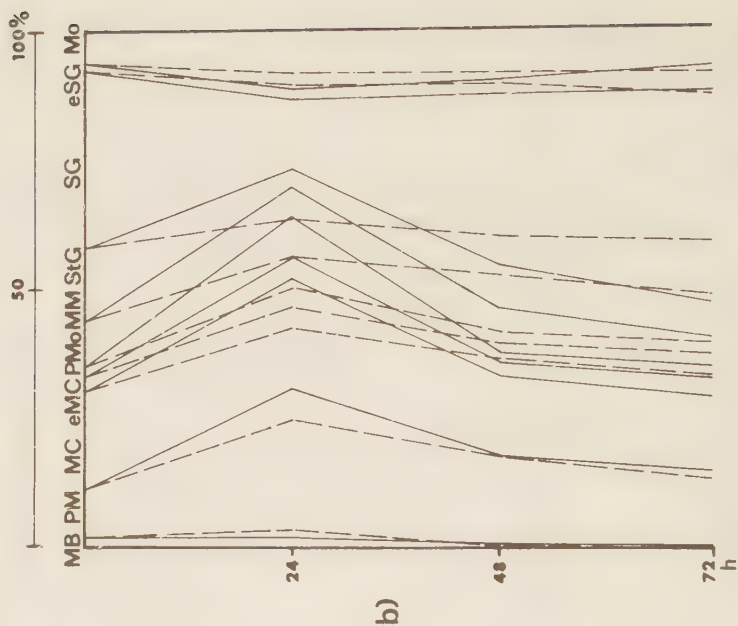


Abb. 3a + 3b: Fall 2 mit der Konzentration VM 26 1,0 µg/ml

Fall 3

Walter K., 69 Jahre

Klinische Diagnose :

Hyperchrome Anämie

Zustand nach Billroth II Op.

Leberparenchymschaden

Bronchopneumonie

Medikation vor dem Sternalpunktat :

Lanicor^R, Refobacin^R

Befund des Sternalpunktates :

Megaloblastäre Reifungsstörung, wahrscheinlich

Vitamin B₁₂-Mangel bei Zustand nach Billroth II Op.

Differentialblutbild :

Ery.	: 1,32/ μ l	Stab.	: 5 %
Hb	: 4,8 g%	Seg.	: 70 %
Hb _E	: 36,4 pg	Lymph.	: 21 %
Leuko.:	4100/ μ l	Mon.	: 4 %
HTK	: 25 %	Anisocyt.	: (+)
		Poikilocyt.:	(+)
Thromboc.:	102.000/ μ l		

Auffallend im Original ist die Linksverschiebung beider Reihen und ein auf 1,69 verkleinerter $\frac{G}{E}$ -Index. In der Versuchsreihe mit der geringeren Konzentration von VM26 erkennen wir nach 24 Std. in der roten Reihe (Abb. 4a) eine Rechtsverlagerung in den Reifungskurven gegenüber den Kontrollkulturen, in der weißen Reihe (Abb. 4b) dagegen eine Linksverlagerung. Nach 48 Std. geht in der roten Reihe die Rechtsverlagerung in Linksverlagerung über, während in der weißen Reihe die Links-

verlagerung beibehalten wird.

In der Versuchsreihe mit der höheren Konzentration finden wir schon nach 24 Std. sowohl in der roten als auch in der weißen Reihe eine Abnahme der teilungsfähigen Zellen gegenüber den Kontrollen. Nach 48 Std. ist die Abnahme in der roten Reihe nicht mehr so erheblich (Abb. 5a u. 5b).

Bei den $\frac{G}{E}$ -Indices erkennen wir ein Abfallen in den Kontrollen gegenüber den Originalen. In den Versuchsreihen finden wir nach 24 Std. keine, nach 48 Std. bei der höheren Konzentration eine bemerkenswerte Erhöhung gegenüber der Kontrolle (Tab. 3).

Die Mitose-Indices der Erythro- und Granulocytopoese sind nach 24 Std. bei der Versuchsreihe mit Konzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$ VM26 nicht erheblich, aber mit der höheren Konzentration VM26 deutlich erniedrigt. Am 2. Versuchstage sind sämtliche Mitose-Indices gegenüber den Kontrollen erniedrigt.

Tabelle 3

		Originale	24 Std.	48 Std.
$\frac{G}{E}$ -I	Kontrolle	1,69	1,49	1,18
	Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$		1,5	1,46
	Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$		1,51	1,95
r M I	Kontrolle	19,91	24,53	21,8
	Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$		21,59	5,32
	Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$		15,72	14,02
w M I	Kontrolle	17,05	14,17	10,19
	Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$		9,05	1,8
	Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$		5,85	2,0

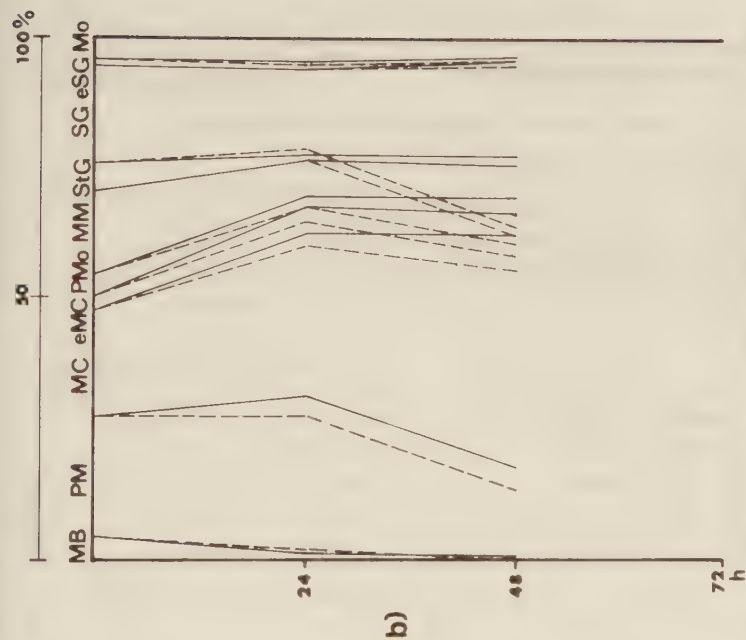
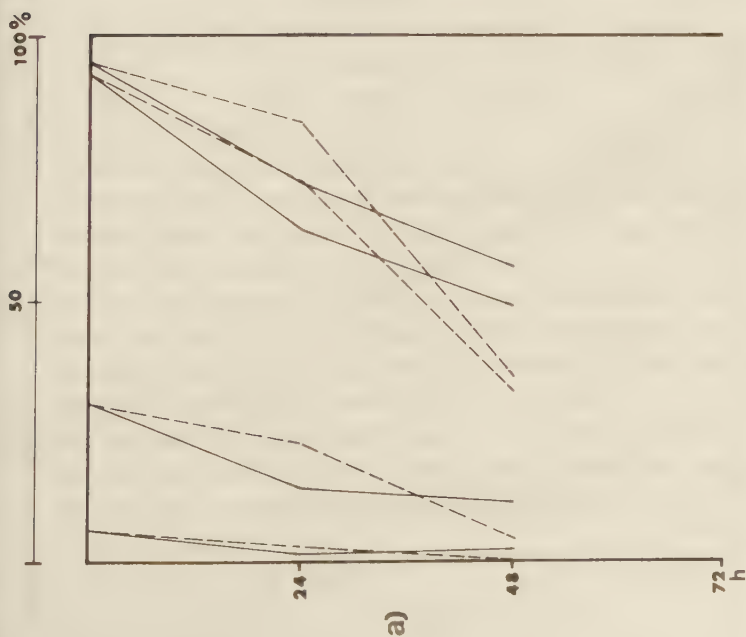
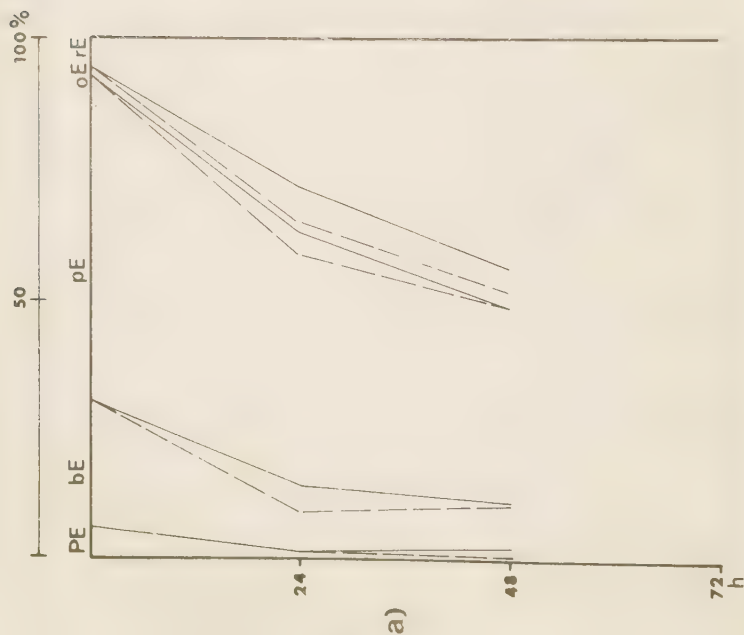


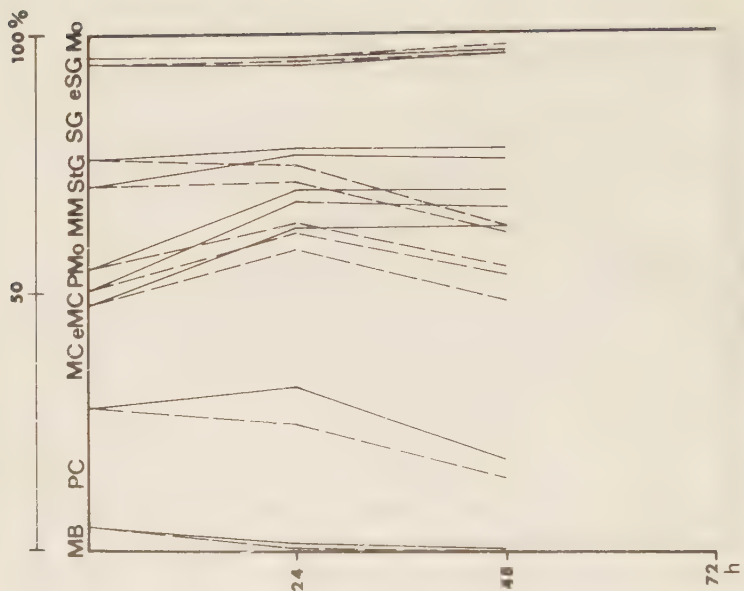
Abb. 4a + 4b: FaN 3 mit der Konzentration VM 26 0,1 µg/ml
Beschreibung der Abb. s. S. 15

Erythropoese



a)

Granulopoese



b)

Abb. 5a + 5b:

Fall 3

mit der Konzentration VM 26 1,0 µg/ml

Beschreibung der Abb. s. S. 15

Fall 4

Werner S., 53 Jahre

Klinische Diagnose :

Passagere Thrombocytopenie unklarer Genese

Befund des Sternalpunktates :

Bis auf eine geringe Vermehrung der Eosinophilen, Promonocyten und Monocyten normaler Knochenmarkbefund.

Differentialblutbild :

Ery. :	4,6/ μ l	Stab. :	2 %
Hb :	14,8 g%	Seg. :	50 %
Hb _E :	31,8 pg	Lymph.:	46 %
HTK :	41,3 %	Eos. :	2 %
Leuko.:	6900/ μ l		
Thromboc.:	168.000/ μ l		

Elektrophorese :	Albumin	50,8 %
	α -1-Globulin	3,1 %
	α -2-Globulin	9,8 %
	β -Globulin	14,2 %
	γ -Globulin	22,1 %
	Ges. Eiweiß	7,47 g%

In der Erythropoese finden wir bei der niedrigeren Konzentration (Abb. 6a) zuerst eine Zunahme der teilungsfähigen Erythroblasten gegenüber den Kontrollen, die nach 72 und 96 Std. einer Zunahme der reifen Erythroblasten weicht.

In der Versuchsreihe mit der höheren Konzentration finden wir schon nach 24 Std. eine Abnahme der teilungsfähigen Zellen, die bis zu 72 Std. anhält und erst nach 96 Std. in eine Abnahme von reifen Erythroblasten überwechselt (Abb. 7a).

Bei der Betrachtung der Reifungskurven der Granulocytopoese fällt auf, daß in beiden Versuchsreihen eine Abnahme der teilungsfähigen Granuloblasten gegenüber den Kontrollen eingetreten ist (Abb. 6b u. 7b).

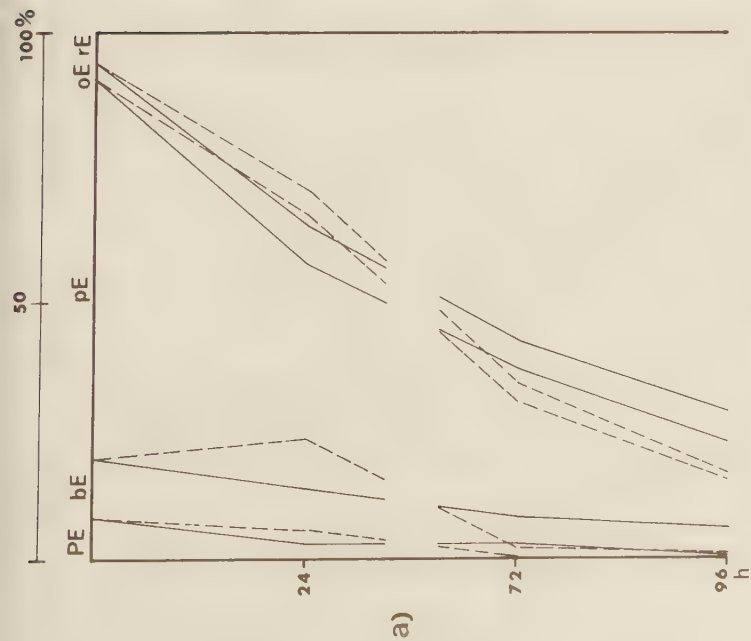
Nach 24 Std. ist sie am auffälligsten, ganz besonders bei der niedrigeren Konzentration. Nach 72 Std. ist der Unterschied nicht mehr so ausgeprägt. Am 4. Tag jedoch nehmen die teilungsfähigen Zellen bei der höheren Konzentration wieder erheblich ab.

Der $\frac{G}{E}$ -Index von 2,09 im Original erhöht sich stetig und läßt zwischen Versuchs- und Kontrollreihen beträchtliche Unterschiede erkennen (Tab. 4).

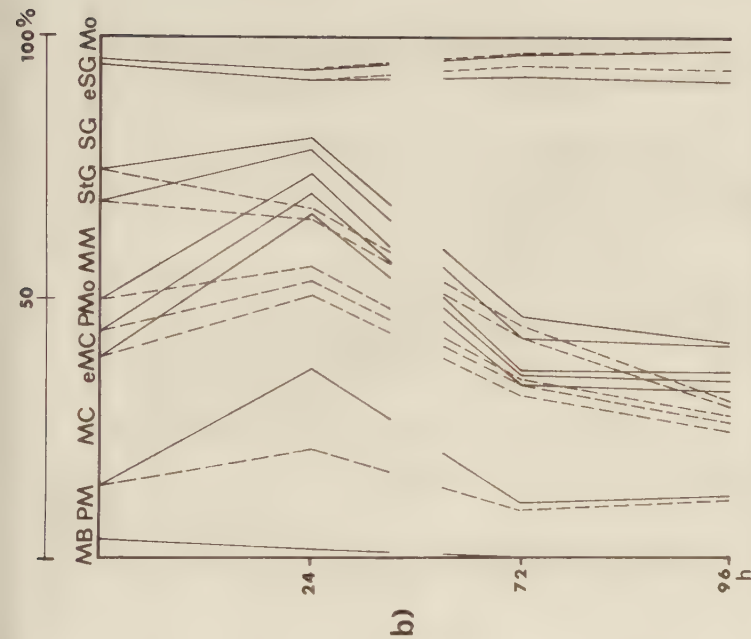
Sämtliche Mitose-Indices sind in den Versuchskulturen niedriger als in den Kontrollkulturen, ausgenommen die des 72-Stunden-Ausstriches, bei dem in der Kontrolle keine Mitosen in der Erythropoese nachgewiesen werden konnten. In der Granulocytopoese ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollreihe nur bei der höheren Konzentration vorhanden. Nach 96 Std. waren bei der Erythropoese in den Versuchskulturen keine Mitosen mehr auffindbar. In der Granulocytopoese sind sie erniedrigt, und zwar bei der höheren Konzentration mehr als bei der niedrigeren Konzentration.

Tabelle 4

		Original	24 Std.	72 Std.	96 Std.
$\frac{G}{E}$ -I	Kontrolle	2,09	2,22	10,66	9,59
	Vers. 0,1 μ g/ml		3,91	3,02	6,99
	Vers. 1,0 μ g/ml		1,43	4,39	18,74
r M I	Kontrolle	22,1	29,51	0	41,6
	Vers. 0,1 μ g/ml		23,8	25,0	0
	Vers. 1,0 μ g/ml		24,26	10,42	0
w M I	Kontrolle	23,17	15,42	11,63	20,41
	Vers. 0,1 μ g/ml		8,5	12,46	16,19
	Vers. 1,0 μ g/ml		11,94	7,53	8,37



a)



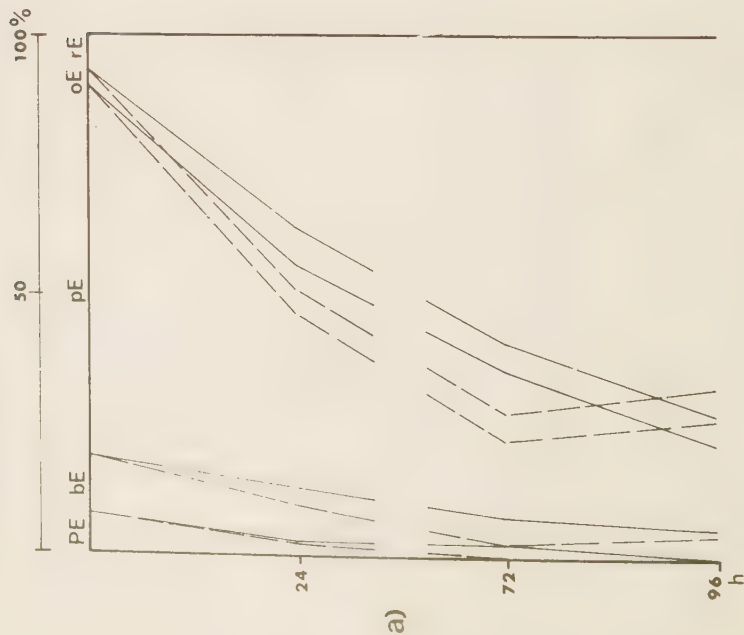
b)

Abb. 6a + 6b: Fall 4

mit der Konzentration VM 26 0,1 µg/ml

Beschreibung der Abb. s.S. 15

Erythropoese



Granulopoese

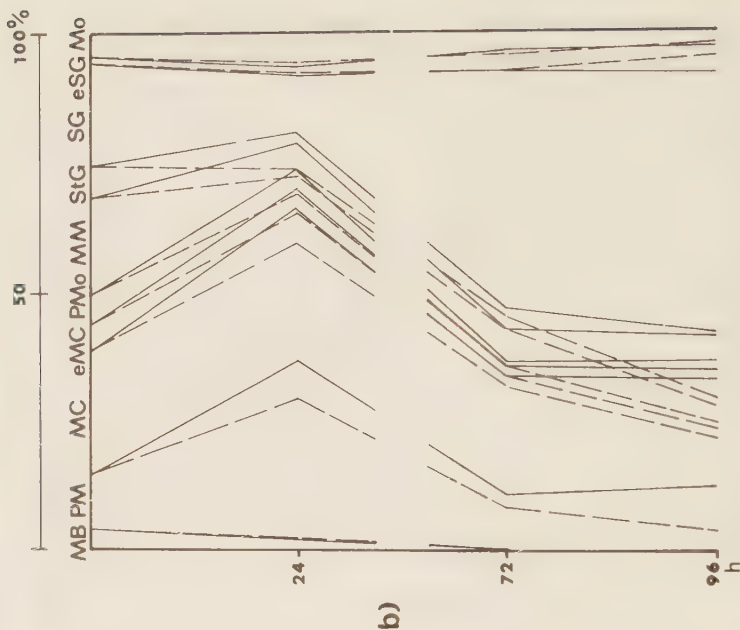


Abb. 7a+7b: Fall 4 mit der Konzentration VM 26 10µg/ml

Beschreibung der Abb. s.S. 15

Fall 5

Willy W., 65 Jahre

Klinische Diagnose :

Spontanfraktur des rechten Schenkelhalses
bei metastasierendem Prostata-Ca
Bronchopneumonie

Medikation vor dem Sternalpunktat :

Rheumasan^R, Togal^R, Lanicor^R, Strophantin^R,
Lasix^R, Euphyllin^R

Befund des Sternalpunktates :

Linksverschobene, gesteigerte Granulocytopoese

Differentialblutbild :

Ery. :	3,65/ μ l	Stab. :	9 %
Hb :	9,9 g%	Seg. :	70 %
Hb _E :	27 pg	Lymph. :	18 %
HTK :	32 %	Mon. :	3 %
Leuko.:	12.200/ μ l	Anisocyt. :	(+)
		Poikilocyt.:	(+)
Thromboc.:	283.000/ μ l		

Elektrophorese :

Albumin	42,8 %
α -1-Globulin	7,2 %
α -2-Globulin	20,3 %
β -Globulin	14,1 %
γ -Globulin	15,6 %
Ges. Eiweiß	6,00 g%

Bei diesem Patienten wurde nur eine Versuchsreihe mit der höheren Konzentration angesetzt. Bei den Reifungskurven dieser Versuchsreihe erkennen wir sowohl bei der Erythropoese als

auch in der Granulocytopoese eine deutliche Linksverlagerung und damit Abnahme der teilungsfähigen Zellen gegenüber den Kontrollen. Nach 48 Std. kommt es in den Zusatzkulturen zu einer geringen Rechtsverlagerung beider Reihen. Nach 96 Std. findet wiederum eine stärkere Linksverlagerung gegenüber den Kontrollen statt (Abb. 8a u. 8b).

Die $\frac{G}{E}$ -Indices sind an allen drei Versuchstagen gegenüber den Originalen erniedrigt. Nach 24 Std. ist die Zunahme des $\frac{G}{E}$ -Indexes gegenüber der Kontrolle mit dem Verhalten der Reifungskurven zu erklären; er steigt an. Nach 48 und 96 Std. bestehen ebenfalls Unterschiede zwischen den $\frac{G}{E}$ -Indices der Versuche und der Kontrollen, die wieder nicht dem Verhalten der Reifungskurven entsprechen (Tab. 5).

Analog den Reifungskurven sind die Mitose-Indices sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulocytopoese gegenüber den Kontrollen mehr, später weniger erniedrigt.

Tabelle 5

		Original	24 Std.	48 Std.	96 Std.
$\frac{G}{E}$ -I	Kontrolle	3,01	1,42	1,91	1,43
	Vers. 1,0 μ g/ml		1,76	1,37	0,83
r M I	Kontrolle	31,11	46,55	43,73	32,0
	Vers. 1,0 μ g/ml		18,37	25,71	26,32
w M I	Kontrolle	13,16	16,45	10,43	20,24
	Vers. 1,0 μ g/ml		9,49	8,85	18,8

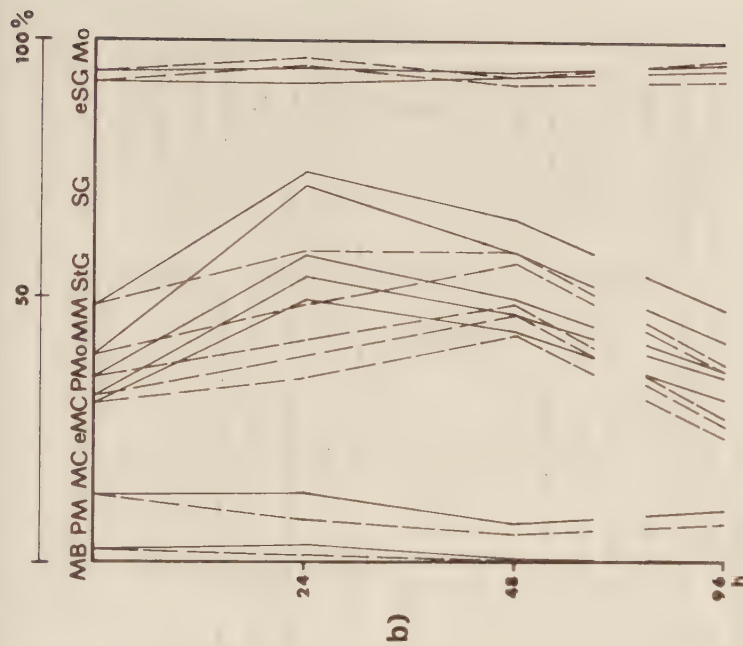
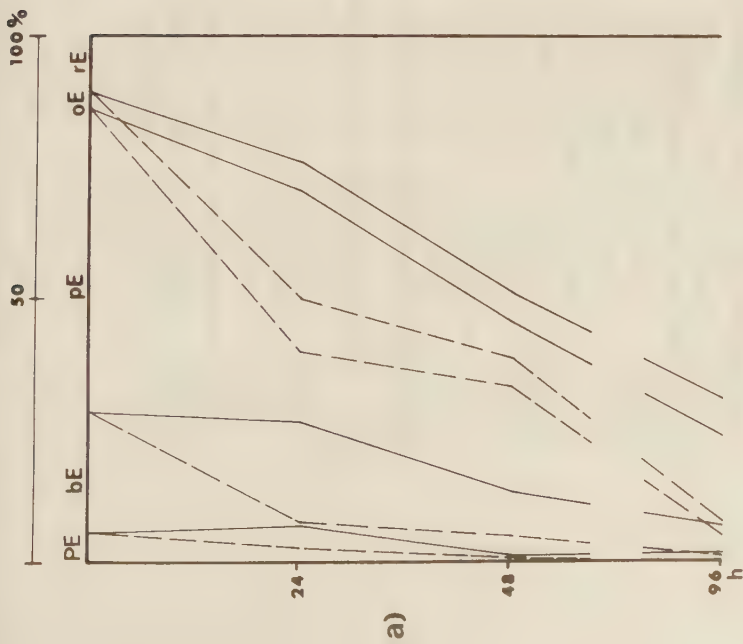


Abb. 8a + 8b: Fall 5 mit der Konzentration VM 26 10 μ g/ml
Beschreibung der Abb. s. S. 15

TABELLE 6 : Die arithmetischen Mittel der zusammengefaßten Fälle nach Konzentration

Versuchsreihe mit VM26 der Konzentration 0,1 μ g/ml Fall 1 - 4									
	Original	Kontr. 24 Std.		Vers. 48 Std.		Kontr. 72 Std.		Vers. 96 Std.	
		Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.
$\frac{G}{E}$ -I	2,05	1,55	1,97	1,33	1,35	4,39	2,27	9,59	6,99
r M I	18,72	24,06	16,69	23,28	10,82	10,06	12,7	41,6	0
w M I	16,13	15,59	9,6	10,7	5,24	10,22	8,6	20,41	16,19
Versuchsreihe mit VM26 der Konzentration 1,0 μ g/ml Fall 2 - 5									
$\frac{G}{E}$ -I	2,48	1,72	1,43	1,67	1,6	5,92	2,91	6,0	9,79
r M I	20,64	20,5	17,03	29,78	17,59	7,39	10,59	35,8	13,16
w M I	15,03	15,04	10,44	11,51	7,76	12,7	8,55	20,32	13,59

B. Signifikanzberechnung

Mit dem χ^2 -Test nach HELMERT PEARSON prüften wir, ob die Abweichungen unserer Ergebnisse sowohl der Mitose-Indices als auch der Reifungskurven bei den Kontroll- und Versuchsreihen zufallsbedingt oder signifikant sind (10).

Bei der Berechnung wandten wir folgende Formel an :

$$\chi^2_{mf} = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

Dabei wurden B durch die beobachtete Zellzahl und E durch die entsprechenden Erwartungswerte ersetzt, wobei die Erwartungswerte nach der Formel $E = p \times n$ errechnet wurden.

Dabei stellte p die relative Häufigkeit in der vereinigten Stichprobe dar, n die Summe der Beobachtungswerte. Für die Anzahl der Freiheitsgrade steht mf, wobei mf gleich der Summe der Anzahl der Einzelwerte beider Reihen vermindert um 1 ist.

Den Wert, den wir für χ^2 erhielten, setzten wir in die von PÄTAU veröffentlichten graphischen Tafeln ein und erhielten dafür einen P-Wert. Ist $P < 0,0027$, so ist die Differenz zwischen beiden Meßreihen statistisch gut gesichert.

Dann ist bei der Berechnung der Reifungskurven auf Signifikanzen χ^2 bei der Erythropoese bei 4 Freiheitsgraden ab Werten $> 16,2$ und bei der Granulocytopoese bei 11 Freiheitsgraden ab Werten $> 28,5$ statistisch gesichert.

Bei der Berechnung der Mitose-Indices auf Signifikanzen berücksichtigen wir 1 Freiheitsgrad, und unsere Ergebnisse sind für χ^2 ab $> 2,96$ statistisch gut gesichert (1).

Den folgenden Berechnungen und graphischen Darstellungen sind die eingangs bei der Differenzierung für die einzelnen Zellen erwähnten Abkürzungen zugrunde gelegt worden.

In Tabelle A - C sind die Berechnung auf Signifikanz für Fall 3 und die Zwischenergebnisse tabellarisch aufgeführt worden.

Tabelle C stellt die Zusammenfassung der einzelnen Werte für χ^2 aller Fälle auf Unterschied dar.

Die Tabellen E und F stellen die Berechnung der Mitosen auf Signifikanz für den einzelnen Fall 1 und 5 dar.

In Tabelle G und H sind die Mitosen aller Fälle für jeden einzelnen Kulturtag zusammengefaßt und auf Signifikanz untersucht worden.

TABELLE A

Fall 3 : Erythropoese 24 Std. VM26 Konz. 0,1 µg/ml

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.
PE	11	17	16,0	12,0	1,56	2,08
bE	93	107	114,3	85,7	3,96	5,27
pE	363	277	365,6	274,4	0,02	0,03
oE	63	63	71,9	54,0	1,12	1,50
rE	215	95	177,1	132,9	8,1	10,8
	745	559			$\chi^2 = 34,44$	

48 Std.

PE	17		9,4	7,5	6,12	7,54
bE	56	24	44,4	35,6	3,02	3,77
pE	245	145	216,6	173,4	3,74	4,66
oE	49	19	37,7	30,2	3,39	4,15
rE	291	339	349,8	280,2	9,88	12,36
	658	527			$\chi^2 = 58,63$	

Granulocytopoese

24 Std.

MB	17	17	19,3	14,6	0,27	0,41
PM	328	217	310,5	234,4	0,98	1,29
MC	347	274	353,9	267,1	0,13	0,18
eMC	55	36	51,8	39,1	0,2	0,24
bMC	3	2	2,8	2,1	0,02	0,00
PMo	23	17	22,7	17,2	0,00	0,00
MM	74	77	86,0	64,9	1,66	2,27
StG	15	17	18,2	13,7	0,56	0,78
SG	177	125	172,0	129,8	0,15	0,18
eSG	13	9	12,5	9,5	0,02	0,02
bSG	1		0,6	0,4	0,36	0,42
Mo	56	46	58,1	43,9	0,08	0,11
	1109	837			$\chi^2 = 10,32$	

48 Std.

MB	6		3,0	2,9	3,12	2,92
PM	131	103	117,7	116,2	1,50	1,50
MC	348	321	336,6	332,3	0,39	0,38
eMC	33	23	28,1	27,8	0,85	0,82
bMC	5	1	3,0	2,9	1,41	1,26
PMo	18	17	17,6	17,4	0,01	0,01
MM	48	90	69,4	68,5	6,60	6,74
StG	15	13	14,0	13,8	0,07	0,05
SG	141	159	150,9	149,0	0,65	0,68
eSG	5	7	6,0	5,9	0,17	0,20
bSG			0	0	0	0
Mo	29	35	32,2	31,8	0,31	0,33
	779	769			$\chi^2 = 29,951$	

TABELLE B

Fall 3 : Erythropoese 24 Std. VM26 Konz. 1,0 μ g/ml

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.	Kontr.	Vers.
PE	11	12	11,2	11,8	0	0
bE	93	59	73,7	78,3	5,04	4,75
pE	363	389	364,7	387,3	0,01	0,01
oE	63	49	54,3	57,7	1,39	1,31
rE	215	282	241,1	255,9	2,82	2,65
	745	791			<u>$\chi^2 = 17,97$</u>	

48 Std.

PE	17	4	12,8	8,1	1,41	2,10
bE	56	39	58,0	37,0	0,07	0,11
pE	245	158	246,2	156,8	0,01	0,01
oE	49	13	37,8	24,1	3,30	5,11
rE	291	205	303,0	193,0	0,48	0,75
	658	419			<u>$\chi^2 = 13,33$</u>	

Granulocytopoese

24 Std.

MB	17	5	10,6	11,4	3,89	3,61
PM	328	287	295,9	319,1	3,48	3,23
MC	347	411	364,7	393,3	0,86	0,8
eMC	55	32	41,9	45,1	4,13	3,83
bMC	3	2	2,4	2,6	0,15	0,14
PMo	23	19	20,2	21,8	0,39	0,36
MM	74	99	83,2	89,8	1,03	0,95
StG	15	35	24,1	25,9	3,41	3,16
SG	177	243	202,1	217,9	3,11	2,89
eSG	13	9	10,6	11,4	0,55	0,51
bSG	1	1	1,0	1,0	0	0
Mo	56	53	52,4	56,6	0,24	0,22
	1109	1196			<u>$\chi^2 = 40,91$</u>	

48 Std.

MB	6	3	4,4	4,6	0,62	0,54
PM	131	112	118,6	124,3	1,29	1,21
MC	348	283	308,2	322,8	5,15	4,91
eMC	33	39	35,1	36,8	0,13	0,13
bMC	5	2	3,4	3,5	0,81	0,65
PMo	18	9	13,2	13,8	1,78	1,66
MM	48	51	48,3	50,6	0	0
StG	15	14	14,1	14,8	0,06	0,04
SG	141	263	197,2	206,6	16,04	15,39
eSG	5	18	11,2	11,8	3,45	3,32
bSG		1	0,5	0,5	0,47	0,53
Mo	29	21	24,4	25,5	0,87	0,81
	779	816			<u>$\chi^2 = 59,85$</u>	

TABELLE C

Fall 3 : Erythropoese

24 Std. VM26 0,1 gegen VM26 1,0

Zell-

typ	Vers.0,1	Vers.1,0	Vers.0,1	Vers.1,0	Vers.0,1	Vers.1,0
PE	17	12	12,0	17,0	2,08	1,47
bE	107	59	68,7	97,3	21,30	15,05
pE	277	389	275,8	390,2	0,01	0
oE	63	49	46,4	65,6	5,96	4,21
rE	95	282	156,1	220,9	23,92	16,90

559

791

$$\chi^2 = 90,897$$

48 Std.

PE	0	4	2,2	1,8	2,21	2,85
bE	24	39	35,1	27,9	3,48	4,45
pE	145	158	168,8	134,2	3,34	4,24
oE	19	13	17,8	14,2	0,08	0,10
rE	339	205	303,0	240,9	4,27	5,36

527

417

$$\chi^2 = 30,375$$

Granulocytopoese

24 Std.

MB	17	5	9	12,9	7,01	4,85
PM	217	287	207,5	296,5	0,44	0,30
MC	274	411	282,0	402,9	0,23	0,16
eMC	36	32	28,0	40,0	2,32	1,58
bMC	2	2	1,6	2,3	0,11	0,03
PMo	17	19	14,8	21,2	0,32	0,22
MM	77	99	72,4	103,5	0,29	0,19
StG	17	35	21,3	30,5	0,88	0,67
SG	125	243	151,5	216,5	4,63	3,25
eSG	9	9	7,4	10,5	0,36	0,22
bSG	0	1	0,3	0,5	0,34	0,57
Mo	46	53	40,7	58,1	0,70	0,45

837

1196

$$\chi^2 = 30,118$$

48 Std.

MB	0	3	1,4	1,5	1,38	1,60
PM	103	112	104,3	110,7	0,02	0,02
MC	321	283	293,0	310,9	2,68	2,50
eMC	23	39	30,1	31,9	1,66	1,58
bMC	1	2	1,4	1,5	0,11	0,19
PMo	17	9	12,6	13,4	1,53	1,44
MM	90	51	62,4	72,5	6,85	6,40
StG	13	14	13,1	13,9	0,0	0,0
SG	159	263	204,7	217,2	10,21	9,65
eSG	7	18	12,1	12,8	2,13	2,10
bSG	0	1	0,5	0,5	0,46	0,53
Mo	35	21	27,2	28,8	2,27	2,12

769

816

$$\chi^2 = 57,407$$

TABELLE D

χ^2 für die übrigen Fälle

Reifungskurven der Erythropoese auf Unterschied

	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
Fall 1				
Kontr. gegen				
Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$	112,10	139,05	40,77	-
Fall 2				
Kontr. gegen				
Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$	36,02	47,26	51,56	-
Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$	26,28	35,63	11,82	-
Fall 4				
K. g. V. 0,1	36,54	-	8,75	7,84
K. g. V. 1,0	18,72	-	12,49	0,78
V. 0,1 g. V. 1,0	93,64	-	4,95	7,56
Fall 5				
Kontr. gegen				
Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$	181,64	49,77	-	92,88

Reifungskurven der Granulocytopoese auf Unterschied

Fall 1				
Kontr. gegen				
Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$	49,85	5,97	52,40	
Fall 2				
Kontr. gegen				
Vers. 0,1 $\mu\text{g/ml}$	89,13	79,51	83,40	
Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$	88,67	17,69	55,15	
Fall 4				
K. g. V. 0,1	146,20	-	5,22	48,91
K. g. V. 1,0	42,76	-	11,70	83,61
V. 0,1 g. V. 1,0	71,81	-	12,99	54,75
Fall 5				
Kontr. gegen				
Vers. 1,0 $\mu\text{g/ml}$	139,18	39,36	-	33,88

TABELLE E

Berechnung der Mitose-Indices auf Unterschied

Fall 1 : Erythropoese 24 Std. Konz. VM26 0,1 $\mu\text{g/ml}$

		B		E		(B-E) ² /E	
		Mitosen Gesamt-		Mitosen Gesamt-		Mitosen Gesamt-	
		zellz.		zellz.		zellz.	
		N.M.					
Kontrolle	21	828		18,3	830,7	0,41	0,01
Versuch	7	444		9,7	441,3	0,75	0,01

$$\chi^2 = 1,19$$

48 Std.

Kontrolle	17	607		15,2	608,8	0,22	0
Versuch	6	316		7,8	314,1	0,42	0,01

$$\chi^2 = 0,66$$

72 Std.

Kontrolle	4	222		2,8	223,2	0,51	0
Versuch	2	254		3,17	252,8	0,43	0

$$\chi^2 = 0,96$$

Granulocytopoese 24 Std.

Kontrolle	11	579		8,67	581,3	0,62	0
Versuch	7	621		9,23	618,7	0,53	0

$$\chi^2 = 1,18$$

48 Std.

Kontrolle	5	629		3,74	630,2	0,42	0
Versuch	3	717		4,24	715,7	0,37	0

$$\chi^2 = 0,8$$

72 Std.

Kontrolle	2	374		1,80	374,2	0,02	0
Versuch	1	246		1,19	245,8	0,03	0

$$\chi^2 = 0,05$$

TABELLE F

Berechnung der Mitose-Indices auf Unterschied

Fall 5 : Erythropoese 24 Std. Konz. VM26 1,0 $\mu\text{g/ml}$

	B		E		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen Gesamt-		Mitosen Gesamt-		Mitosen Gesamt-	
	zellz.		zellz.		zellz.	
	N.M.					
Kontrolle	29	594	22,3	600,6	2,01	0,07
Versuch	7	374	13,6	367,3	3,23	0,12

$$\chi^2 = 5,437$$

48 Std.

Kontrolle	15	328	11,9	331,1	0,83	0,02
Versuch	9	341	12,1	337,9	0,8	0,02

$$\chi^2 = 1,683$$

96 Std.

Kontrolle	4	121	3,8	121,2	0,01	0
Versuch	1	37	1,2	36,8	0,02	0

$$\chi^2 = 0,032$$

Granulocytopoese 24 Std.

Kontrolle	14	837	11,2	839,7	0,68	0
Versuch	7	731	9,7	728,2	0,77	0,01

$$\chi^2 = 1,47$$

48 Std.

Kontrolle	8	765	7,2	765,7	0,09	0
Versuch	6	713	6,7	712,2	0,07	0

$$\chi^2 = 0,164$$

96 Std.

Kontrolle	5	242	4,8	242,2	0,01	0
Versuch	3	162	3,2	161,8	0,01	0

$$\chi^2 = 0,022$$

TABELLE G

Berechnung der Mitosen auf Unterschied

Fälle 1 - 4 nach Konzentration zusammengefaßt

		Erythropoese		24 Std.		Konz. VM26 0,1 µg/ml	
		B		E		(B-E) ² /E	
		Mitosen	Gesamt-	Mitosen	Gesamt-	Mitosen	Gesamt-
		zellz.	zellz.	zellz.	zellz.	zellz.	zellz.
		N.M.					
Kontrolle	51	2093	43,3	2100,7	1,37	0,03	
Versuch	27	1692	34,7	1684,3	1,71	0,04	
							$\chi^2 = 3,149$
48 Std.							
Kontrolle	33	1342	26,4	1348,6	1,63	0,03	
Versuch	10	852	16,6	845,4	2,61	0,05	
							$\chi^2 = 4,321$
72 Std.							
Kontrolle	10	638	8,2	639,7	0,38	0,01	
Versuch	5	520	6,7	518,3	0,42	0,01	
							$\chi^2 = 0,808$
		Granulocytopoese		24 Std.			
Kontrolle	45	2945	36,8	2952,9	1,84	0,02	
Versuch	27	2848	34,8	2794,9	1,75	0,02	
							$\chi^2 = 3,635$
48 Std.							
Kontrolle	19	1776	14,0	1780,8	1,79	0,01	
Versuch	10	1879	14,7	1874,1	1,52	0,01	
							$\chi^2 = 3,332$
72 Std.							
Kontrolle	9	903	8,6	903,3	0,02	0	
Versuch	10	1086	10,3	1085,6	0,01	0	
							$\chi^2 = 0,03$

TABELLE H

Berechnung der Mitosen auf Unterschied

Fälle 2 - 5 nach Konzentration zusammengefaßt

Erythropoese		24 Std.		Konz. VM26 1,0 µg/ml	
	B		E		(B-E) ² /E
	Mitosen	Gesamt-	Mitosen	Gesamt-	Mitosen
	zellz.	zellz.	zellz.	zellz.	zellz.
	N.M.				
Kontrolle	59	1859	45,5	1872,4	4,04 0,10
Versuch	33	1923	46,4	1909,5	3,85 0,10
$\chi^2 = 8,075$					
48 Std.					
Kontrolle	31	1063	25,7	1068,2	1,09 0,03
Versuch	17	930	22,3	924,7	1,24 0,03
$\chi^2 = 2,386$					
72 Std.					
Kontrolle	6	416	5,3	416,7	0,10 0
Versuch	4	371	4,7	370,3	0,10 0
$\chi^2 = 0,203$					
Granulocytopoese		24 Std.			
Kontrolle	48	3193	40,5	3200,2	1,38 0,02
Versuch	28	2803	35,4	2795,3	1,54 0,02
$\chi^2 = 2,963$					
48 Std.					
Kontrolle	22	1912	18,6	1919,9	0,64 0
Versuch	14	1769	17,1	1770,0	0,57 0
$\chi^2 = 1,203$					
72 Std.					
Kontrolle	7	530	5,3	531,7	0,57 0,01
Versuch	9	1073	10,6	1071,3	0,24 0
$\chi^2 = 0,824$					

C. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Einwirkung von VM26 auf menschliches Knochenmark in vitro benutzten wir in Anlehnung an STÄHELIN zwei verschiedene Konzentrationen, $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $1,0 \mu\text{g/ml}$.

In den Versuchsreihen konnten im Vergleich zu den Kontrollen morphologische Veränderungen weder bei der niedrigeren noch bei der höheren Konzentration eindeutig festgestellt werden. Vakuolen und Pinocytose fanden sich in allen Fällen an allen Kulturtagen, am häufigsten in Fall 1 und am seltensten in Fall 5.

Der Unterschied zwischen den Reifungskurven der Versuchsreihe und denen der Kontrolle konnte in allen Fällen und für beide Konzentrationen durch die Signifikanzberechnung meistens bestätigt werden (Tab. A - D).

Da sich in den einzelnen Versuchen erkennbare Parallelen zeigten, faßten wir die Ergebnisse der einzelnen Fälle mit der gleichen Konzentration VM26 zusammen und stellten sie getrennt in je einer Reifungskurve für die entsprechende Konzentration dar (Abb. 9a, 9b, 10a u. 10b).

1. In der Versuchsreihe mit einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ VM26 haben bei den Mittelwert-Reifungskurven der Erythropoese (Abb. 9a) die teilungsfähigen Zellen nach 24 Std. nur gering abgenommen. Nach 48 und 96 Std. ist diese Abnahme der teilungsfähigen Zellen gegenüber den Kontrollen verstärkt. Sie ist zu diesen Stichpunkten am deutlichsten vorhanden. Am 3. Versuchstag ist der Unterschied zu den Kontrollen weniger ausgeprägt. In der Versuchsreihe mit der höheren Konzentration finden wir gegenüber den Kontrollen bei der Erythropoese (Abb. 10a) an den einzelnen Kulturtagen bis 72 Std. eine gleichmäßige Ab-

nahme der teilungsfähigen Zellen. Nach 96 Std. hat sich das prozentuale Verhältnis noch weiter zugunsten der reifen Zellen verschoben.

In der Granulocytopoese finden wir in den Mittelwertkurven mit der geringeren Konzentration VM26 (Abb. 9b) im Gegensatz zu den Kontrollen nur nach 24 und 96 Std. eine Abnahme der teilungsfähigen Zellen. Am 2. und 3. Kulturtag überwiegt eine geringe Zunahme derselben.

Die Reifungskurven, in denen alle Fälle mit der höheren Konzentration zusammengefaßt sind (Abb. 10b), ergeben in der Granulocytopoese nur nach 72 Std. eine geringgradige Zunahme der teilungsfähigen Zellen im Gegensatz zu den Kontrollkurven.

2. Nach 24 und 48 Std. finden wir in den Kontrollkulturen eine Zunahme der Mitoseaktivität, und zwar eine größere in der roten als in der weißen Reihe. Der rote Mitose-Index des Sternalpunkttates ist nur in Fall 5 um ca. 16 % erhöht, und zwar auf 31,1 %; bei allen anderen Patienten entspricht er der Norm bzw. ist nur leicht erhöht. Sowohl in der roten als auch in der weißen Reihe sind die Mitose-Indices durch beide Zusätze bei beiden Konzentrationen meistens erniedrigt (Tab. 1 - 5). Diese Unterschiede konnten durch Berechnung auf Signifikanz wegen der geringen Anzahl von Mitosen nicht gesichert werden. Erst die Zusammenfassung aller Mitosen für die einzelnen Kulturtage (Mittelwerttabelle 6) ließ eine Signifikanz erkennen, für die Versuchsreihe mit der niedrigeren Konzentration bis zu 48 Std., mit der höheren Konzentration bis zu 24 Std. (Tab. G u. H).

3. Die karyologischen Kurven stellen die prozentuale graphische Darstellung der Verteilung der einzelnen Mitosephasen dar. Sie zeigen in den Kontrollversuchen der Erythropoese und Granulocytopoese nur geringe Abweichungen von der in der Literatur angegebenen normalen Verteilung der Mitosephasen (Abb. 11b). In der Granulocytopoese - beide Kontrollkurven (11a u. 11b) gleichen sich sehr - finden wir einen etwas verringerten

Anteil an frühen Metaphasen vor.

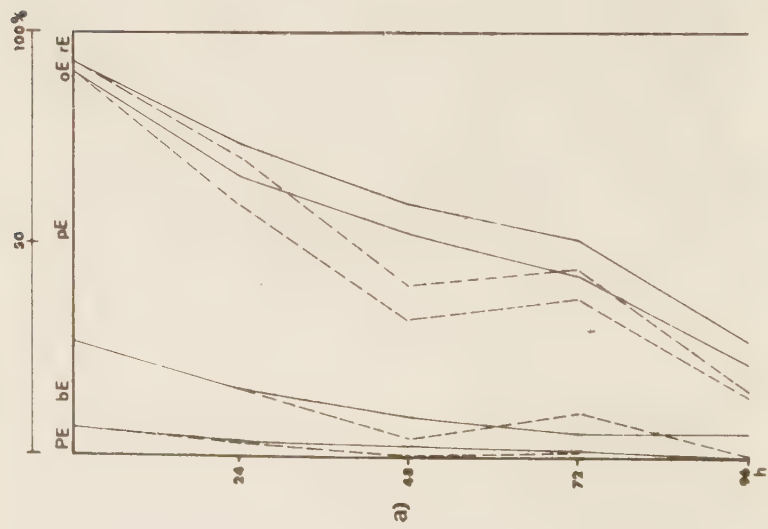
In den Versuchsreihen mit der geringeren Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ VM26 finden wir einen von den Kontrollen nur gering abweichenden Kurvenverlauf. Dabei kommt es in der Erythropoese zu einem geringgradigen Ansteigen der frühen und in der Granulocytopoese der späten Metaphasen. In der Versuchsreihe mit der höheren Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ VM26 ist diese Tendenz stärker ausgeprägt, so daß der Eindruck von einer Anhäufung früher bzw. später Metaphasen entsteht.

4. Die $\frac{G}{E}$ -Indices verhalten sich nicht immer entsprechend den Reifungskurven und Mitose-Indices. Die Mittelwerte zeigen bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ erst eine Erhöhung, später eine Erniedrigung (Tab. 6). Bei der Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ ist das Verhalten uneinheitlich.

So können wir feststellen, daß die Regeneration sowohl der Erythropoese als auch der Granulocytopoese deutlich gehemmt ist, ausgedrückt in erniedrigten Mitose-Indices bei leicht gehemmter karyologischer Kurve und durch die prozentuale Abnahme der teilungsfähigen Zellen bei der Erythropoese über den ganzen Beobachtungszeitraum, bei der Granulocytopoese vorwiegend nach 24 Stunden.

Die Reifung schreitet in der Granulocytopoese unbehindert fort. In der Erythropoese ist sie verstärkt.

Erythropoese



Granulopoese

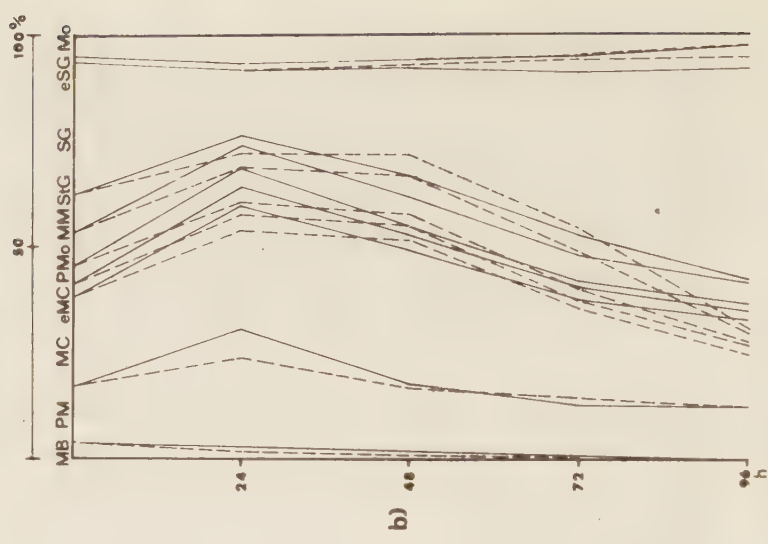
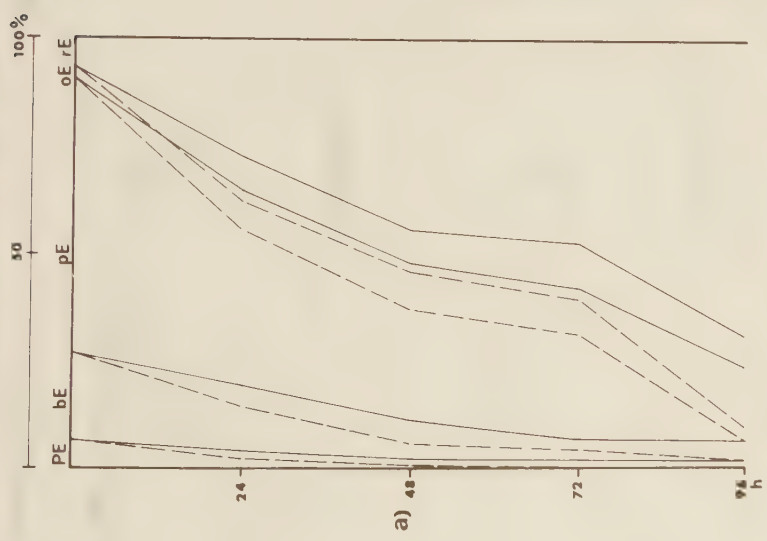


Abb. 9a + 9b: MITTELWERTKURVEN Fall 1 - 4 der Konz. VM26 0,1 µg/ml

Beschreibung der Abb. s. S. 15

Erythropoese



Granulopoese

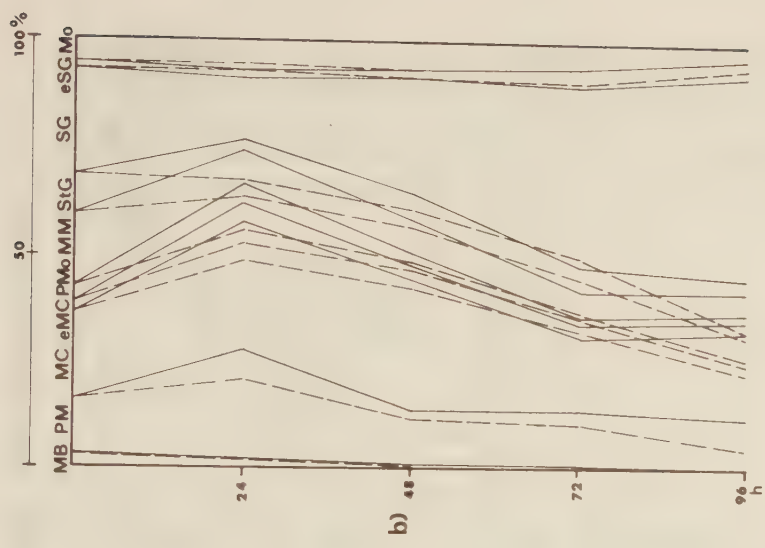


Abb. 10a + 10b: MITTELWERTKURVEN Fall 2-5 der Konz. VM 26 10µg/ml
Beschreibung der Abb. S. 15

KARYOLOGISCHE KURVEN

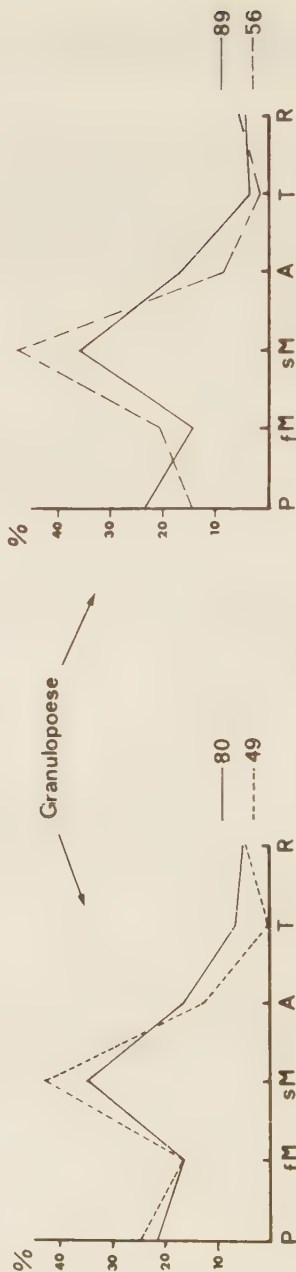
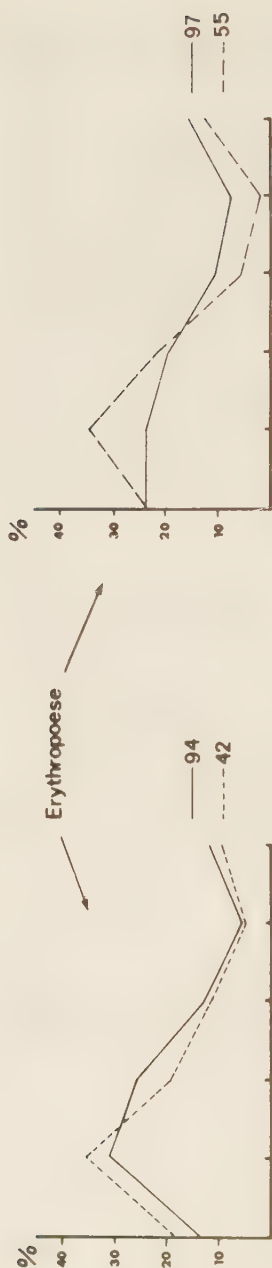


Abb. 11a: Konz. VM26 0,1 µg/ml

Abb. 11b: Konz. VM26 1,0 µg/ml

Beschreibung der Abb. s. S. 49

Die Abbildungen 11a und 11b stellen Kurven für die Verteilung der Mitosephasen der Kontrollen mit entsprechendem VM26-Zusatz für Erythro- und Granulocytopoese getrennt dar.

Die Zahlen rechts neben den karyologischen Kurven entsprechen jeweils für Versuch und Kontrolle 100 %.

Dabei sind

P	Prophase
fM	frühe Metaphase
sM	späte Metaphase
A	Anaphase
T	Telophase
R	Rekonstruktionsphase

————— Kontrollkulturen

----- VM26-Zusatz der Konzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$

— — — — — VM26-Zusatz der Konzentration 1,0 $\mu\text{g/ml}$

IV. DISKUSSION

In unseren Versuchsreihen verwendeten wir ein Podophyllinderivat der Fa. SANDOZ - bezeichnet mit VM26 -, welches einen anderen Wirkungsmechanismus als die früher synthetisierten Derivate der gleichen Grundsubstanz aufweist (15). Da bisher nur wenig Literatur über die Wirkung von VM26, insbesondere über die auf das menschliche Knochenmark vorliegt, sahen wir uns veranlaßt, den direkten Einfluß von VM26 auf menschliche Knochenmarkzellkulturen zu untersuchen und mit der Wirkung des früher untersuchten SP-I zu vergleichen.

Die Knochenmarkszellen sind zur Prüfung von Zytostatika gut geeignet, weil sie eine sehr hohe Proliferationsrate aufweisen und toxische Einflüsse durch morphologische Veränderungen schnell erkennen lassen. Die Toxizität eines Zytostatikums erkennen wir an der Zerstörung von Zellen. Im übrigen besteht die Wirkung des Zytostatikums in der Beeinflussung der Kinetik der Zellen, also ihrer Proliferation, die sich am Knochenmark aus der Regeneration und der Ausreifung zusammensetzt. Bei der Betrachtung der Zellen auf morphologische Veränderungen hin konnte ein toxischer Effekt auch mit der höheren Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ VM26 nicht festgestellt werden.

Sowohl in der Erythro- als auch in der Granulocytopoese finden wir eine dosisunabhängige Verminderung der Regeneration unter dem Einfluß von VM26. Bei der Erythropoese ist diese durch die signifikant verminderten Mitose-Indices und eine relative Vermehrung der frühen Metaphasen erkennbar. Bei der Granulocytopoese ist nach den ebenfalls signifikant erniedrigten Mitose-Indices und den karyologischen Kurven mit Vermehrung der späten Metaphasen die Regeneration ebenfalls vermindert.

Die karyologischen Kurven geben Aufschluß über die Verteilung

der einzelnen Mitosephasen. Sie lassen erkennen, daß die Verteilung der Mitosephasen unter $0,1 \mu\text{g/ml}$ VM26-Zusatz nahezu dieselbe ist wie bei den Kontrollen, also keinen Effekt auf den Mitoseablauf zeigt. Damit werden die von STAHELIN an Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen gefundenen Ergebnisse, daß VM26 den Beginn der Mitose in den Zellen verhindert, bestätigt. Der Einfluß der Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ VM26 führt aber an menschlichen Knochenmarkkulturen nicht zu einer weitgehenden Verhinderung der mitotischen Zellteilung wie bei den Fibroblastenkulturen STAHELIN's (15). Diese Konzentration wirkt am Knochenmark wie die anderen Podophyllinderivate auch hemmend auf den Ablauf der Mitose (6) mit einer wenn auch nicht sehr ausgeprägten Zunahme der Metaphasen. Durch diese Hemmung des Mitoseablaufes wird die Zellvermehrung oder Mitosehäufigkeit der haematopoetischen Vorstufen (3) starker reduziert, als dem ohnehin signifikant erniedrigten Mitose-Index entspricht.

Bei der Beurteilung der Reifung der Erythropoese aller zusammengefaßten Versuche der entsprechenden Konzentration fällt eine an den einzelnen Kulturtagen gleichermaßen ausgeprägte, beschleunigte Ausreifung der Zellen gegenüber den Kontrollen auf. Die signifikant beschleunigte Reifung von Erythroblasten - ausgedrückt durch die Linksverschiebung der Reifungskurven gegenüber den Kontrollen - ist mit der Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ VM26 deutlicher vorhanden als mit der Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$; somit wirkt VM26 über die Regeneration hinaus auch auf die Reifung. Die beschleunigte Reifung, bedingt durch die Vermehrung reifer Erythroblasten, läßt sich als relative Abnahme der teilungsfähigen Erythroblasten infolge der Verminderung der Mitosehäufigkeit und der zusätzlich erniedrigten $\frac{G}{E}$ -Indices als Entkernungsstörung deuten. Diese ist oft ein Äquivalent der Mitosehemmung.

Bei der Granulocytopoese ist in den Mittelwertkurven durch VM26 eine beschleunigende Wirkung auf die Ausreifung bei den

Versuchen gegenüber den Kontrollen nur gering ausgeprägt. Mit der niedrigeren Konzentration ist die Reifungsbeschleunigung nur nach 24 und 96 Std. festzustellen (Abb. 9b), mit der höheren Konzentration bei allen Stichproben ausgenommen nach 72 Std. (Abb. 10b). Dieser beschleunigende Effekt von VM26 auf die Ausreifung ist wie bei der Erythrocytopoese durch seine hemmende Wirkung auf die Mitose bedingt, da infolge dieser Regenerationshemmung die Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten fehlt.

Die Proliferation der Erythropoese ist deutlicher gehemmt als bei der Granulocytopoese, was im erhöhten $\frac{G}{E}$ -Index bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ nach 24 Std. zum Ausdruck kommt (Tab. 6). Die Dosierungen von VM26, die bei Tumoren in vivo und Fibroblastenkulturen den Ablauf der Mitose hemmen (15, 16, 20), beeinträchtigen also auch die Proliferation der Erythro- und Granulocytopoese. An menschlichen Knochenmarkkulturen findet sich aber im Gegensatz zu STÄHELIN's Versuchen (15) außer der Hemmung des Mitoseeintritts noch eine gewisse Wirkung auf den Mitoseablauf. Die Reifung beider Reihen wird durch die Regenerationshemmung der teilungsfähigen Zellen scheinbar beschleunigt. Mit der Wirkung von SP-I verglichen (6), können wir mit der Konzentration von $1,0 \mu\text{g/ml}$ VM26 keine Zunahme von Prophasen und mit der Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ im Gegensatz zu SP-I signifikant erniedrigte Mitose-Indices als Ausdruck der verminderten Regeneration und statt der Reifungshemmung eine Reifungsförderung der Erythropoese erkennen. Die Granulocytopoese ist mit VM26 in der Regeneration signifikant gehemmt, während die Proliferation derselben mit SP-I stimuliert wurde.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von VM26, einem Podophyllotoxin-Glucosid-Derivat, wurde an Koagulumkulturen von nur wenig pathologisch veränderten humanen Knochenmark untersucht.

Die Ergebnisse wurden sowohl in Reifungs- und karyologischen Kurven als auch in Mitose- und $\frac{G}{E}$ -Indices bis zu vier Kulturtagen dargestellt.

Es zeigte sich ein deutlich hemmender Effekt auf die Proliferation, d. h. auf die Regeneration und Ausreifung. Die Regeneration war nach den Mitose-Indices meistens statistisch signifikant gehemmt - hinzu kam eine Hemmung des Mitoseablaufes in der Metaphase -, wodurch die teilungsfähigen Zellen vermindert wurden. Dadurch schien die Ausreifung - ebenfalls statistisch signifikant - beschleunigt, jedoch stärker bei der Erythropoese als bei der Granulocytopoese.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BELITZ, H.-J. Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Ernst Klett Verlag, Stuttgart (3/60)
2. BOLL, I. u. G. FÜCHS Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII, 257, 1961
3. BOLL, I. Granulocytopoese unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1966
4. BOLL, I. u. G. MERSCH Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut XVII, 193 (1968)
5. BOLL, I. u. G. MERSCH Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulocytopoese in vitro.
Blut XIX, 257 (1969)
6. BOLL, I. Die Wirkung von Podophyllinsäure-äthyl-hydrazid auf die Proliferationskinetik von menschlichem Knochenmark in vitro.
Klin. Wschr., 47, 510 (1969)
7. BURG VAN DER, M.E.L. and L.M. VAN PUTTEN Cell kinetics and the form of cell survival curves after chemotherapy.
7th Internat. Congr. of Chemotherapy, Prague, Aug. 1971

8. CLINICAL SCREENING
GROUP of E.O.R.T.C.

Clinical screening (phase I trial)
of VM26 in cancer chemotherapy.

7th Internat. Congr. of Chemotherapy,
Prague, Aug. 1971

9. EMMENEGGE, H.,
H. STÄHELIN,
J. RUTSCHMANN,
A. v. WARTBURG

Zur Chemie und Pharmakologie der
Podophyllum-Glukoside und ihrer
Derivate.

Arzneimittelforschung 11 : 327,459
(1961)

10. GEIGY, J. R.

Geigy documenta.

Wissenschaftliche Tabellen, Basel
1960

11. GRADWOHL, P.R. and
STÄHELIN, H.

Effect of VM26. A Podophyllotoxin-
Glucoside Derivative, on the uptake
of ³H-Thymidine, ³H-Uridine and ³H-
Leucine by P-815 Mastocytoma cells
in vitro.

10th Internat. Cancer Congress
Houston, May 1970

12. HECKNER, F.

Leitfaden der Blutzellkunde.

Urban und Schwarzenberg München
und Berlin 1965

13. LENZNER, W.

Podophyllineinwirkung auf die Pro-
liferationskinetik von menschlichem
Knochenmark in vitro.

Med. Diss. FU Berlin 1968

14. ROHR, K.

Das menschliche Knochenmark.

Georg Thieme Verlag Stuttgart (1960)

15. STÄHELIN, H.

4'-Demethyl-epipodophyllotoxin
Thenylidene Glucoside (VM26), a
Podophyllum Compound with a new
Mechanism of Action.

Europ. J. Cancer Vol. 6 pp. 303-311

16. STÄHELIN, H. VM26, a new Podophyllotoxin Glucoside Derivative with anti-L-1210 Activity.
Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 10,86
17. STÄHELIN, H. u. A. CERLETTI Experimentelle Ergebnisse mit den Podophyllum-Cytostatika SP-I und SP-G.
Schweiz. Med. Wschr. 94, 1490 (1964)
18. STOBBE, H. Hämatologischer Atlas.
Akademie Verlag Berlin 1970
19. SVEC, F. u. C. ALTANER Die Wirkung von Proresid^R auf Wachstum und Metastasenbildung des R61-Rattensarkoms.
Med. Klin. Wschr. 52, 2119 (1968)
20. TRANEKJER, A.S., A.K.J. BRACHETTI In vitro Behaviour of gynecological Tumors against a new Podophyllotoxin-Derivative VM26.
7th Internat. Congr. of Chemotherapy, Prague, Aug. 1971
21. TREMPER, G., M. SYKES, C. YOUNG and J. KRAKOFF Phase 1 trial of the Podophyllotoxin-Derivative VM26.
Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 11, 79
1970

Für die Überlassung des vorliegenden Dissertationsthemas sowie für die Aufsicht und die fachliche Beratung bei der Anfertigung der Dissertationsarbeit bin ich Frau Professor Dr. med. I. Boll und für die Beratung bei der Signifikanzberechnung Herrn Professor H. J. Belitz zu größtem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1. 10. 1941 in Dresden geboren. Besuch der 1. Grundschule in Meißen und danach der Mittelschule.

1954 für ein Jahr an Lungenentzündung und Tbc erkrankt.

1957 Abschlußprüfung der Grundschule und 1959 der Mittelschule. Anschließend Beginn einer Lehre als Kfz-Mechaniker.

Von 1960 an nebenher Besuch der Abendoberschule in Meißen.

1961 Fortsetzung der Lehre in Düsseldorf bei der Daimler-Benz-AG und vorzeitige Beendigung Oktober 1962. Bis März 1963 als Geselle in Lehrfirma tätig. Danach Wiederaufnahme des Schulbesuches in Berlin und Reifeprüfung im März 1966 an der Robert-Blum-Schule in Berlin-Schöneberg.

Im Sommer 1966 Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Freien Universität Berlin.

Vorphysikum im April 1967, Physikum im Oktober 1968 und Staatsexamen im August 1971.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSP,
Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
unterstützt.

